

MINISTERIE VAN LANDBOUW

Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek

Kommissie voor Toegepast Wetenschappelijk Onderzoek

in de Zeevisserij (T.W.O.Z.)

(Voorzitter : F. LIEVENS, directeur-generaal)

**AANPASSING VAN DE GERBERMETHODE VOOR DE
KWANTITATIEVE BEPALING VAN VET IN HARING**

D. DECLERCK en R. DE CLERCK.

Onderwerkgroep „Visverwerkende Bedrijven - Voorverpakking Vis ” (I.W.O.N.L.)

Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent)

Publikatie nr 49 - VB/13/1971.

MINISTERIE VAN LANDBOUW

Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek

Kommissie voor Toegepast Wetenschappelijk Onderzoek

in de Zeevisserij (T.W.O.Z.)

(Voorzitter : F. LIEVENS, directeur-generaal)

62755

**AANPASSING VAN DE GERBERMETHODE VOOR DE
KWANTITATIEVE BEPALING VAN VET IN HARING**

D. DECLERCK en R. DE CLERCK.

Onderwerkgroep „Visverwerkende Bedrijven - Voorverpakking Vis” (I.W.O.N.L.)

Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent)

Publikatie nr 49 - VB/13/1971.

INLEIDING.

De noodzaak om over een vlugge vetbepalingsmethode voor vis te kunnen beschikken, doet zich voornamelijk voor in de visverwerkende nijverheden. Juist hier worden bepaalde vetrijke visprodukten zoals haring, heilbot en makreel bewerkt.

Het ligt voor de hand dat de bepaling van het vetgehalte zo snel mogelijk moet gebeuren. De korte tijd tussen de aanvoer en het bewerken van vis laat een tijdrovende analyse met de soxhlet methode niet toe.

Voor bedrijfslaboratoria moet eerder worden uitgezien naar een snelle vetbepalingsmethode die met eenvoudige apparatuur is uit te voeren.

De standaard methode die voor vaste monsters wordt gebruikt, komt neer op een extractie met een vluchtige oplosmiddel in een soxhletapparaat. De duur van de extractie varieert van 4 tot 24 uur. Daarbij komt nog de tijd die vereist is om het oplosmiddel van het extract af te distilleren en het residu tot konstant gewicht te drogen.

Vloeibare monsters worden meestal geanalyseerd volgens de gravimetrische Rose-Gottlieb methode, die in vereenvoudigde vorm bekend staat als de Mojonnier methode. Het monster wordt dan met ammoniumhydroxyde behandeld en achtereenvolgens met ethyl-alkohol, ethylether en petroleumether uitgeschud.

De Werner - Schmitdt methode is sterk gelijkend aan de Rose - Gottlieb methode, maar maakt gebruik van heet zuur in plaats van ammoniumhydroxide om het vet vrij te stellen.

Naast de standaard methode bestaan ook nog de brekings-index methodes. Een voorbeeld hiervan is de Firi methode die door Ederzeel en Ritokes (1) voor het bepalen van het vetgehalte in vismeel wordt aangewend. Over het algemeen geven de brekings-index methodes resultaten die lichtjes hoger liggen dan de gegevens die met de referentie methodes worden bekomen.

Bij de soortelijke dichtheid methodes wordt het staal met een oplosmiddel voor vet vermengd, waarna het verschil in dichtheid tussen het zuiver oplosmiddel en de oplossing wordt gemeten. Deze methode werd door verscheidene vorsers onderzocht. Herty en al. (2) gebruikten CCl_4 , terwijl Harris (3) het O. dichlorabenzeen als oplosmiddel aanwendden. Het O. dichlorobenzeen verdient de voorkeur. Het is niet ontvlambaar, weinig vluchtig en heeft een soortelijk gewicht dat werkelijk van dit van vet verschilt. De gehele bepaling duurt 30 minuten.

De infra-rood methodes maken gebruik van infra-rode stralingen. Bartels en Gerigh (4) bestudeerden de "Ultra X" apparaat als snelle methode voor de determinatie van water en vet in vleesprodukten.

Nucleaire magnetische resonantie - (5), X-stralen - (6) en microgolven absorptie methodes (7) zijn als snelle methodes voor de vetbepaling bekend. De toestellen zijn echter duur en alleen voor research geschikt.

De Bligh en Dyer methode (8) is ongetwijfeld een van de voornaamste extractie methodes. Deze methode werd door verscheidene onderzoekers aangepast, o.a. door Winter (9) en uitgewerkt voor vlees, kaas, bonen, gedroogde melk en vis. Voor verse vis en vismeel wordt gebruik gemaakt van een éénfazig polair oplosmiddel dat uit chloroform, methanol en water bestaat.

Bij de fotometrische methodes is de Milko Tester (10) goed bekend. Deze methode werd speciaal ontworpen om het vetgehalte van de melk te bepalen.

Onder de volumetrische methodes wordt de Gerber methode gebruikt als een snelle routinemethode voor de bepaling van het vetgehalte in melk- en zuivelprodukten. In Amerika wordt gewoonlijk de Babcock methode toegepast. In tegenstelling met de Gerber methode wordt van een ander type van kolf gebruik gemaakt, waarbij geen amylalkohol wordt toegevoegd.

De snelheid en eenvoud van de Gerber- en Babcock methodes hebben tot verscheidene pogingen geleid om ze te verbeteren en geschikt te maken voor andere produkten (11, 12, 13, 14).

Onderhavige studie brengt een bijdrage tot het onderzoek omtrent de aanpassing van de Gerber methode voor de kwantitatieve bepaling van vet in haring.

1. METHODEN EN MATERIAAL.

1.1. Laboratoriummethodes.

a) Vetbepaling volgens de Soxhlet methode.

In een extractiehuls wordt een staal van 5 tot 10 gr. visvlees zorgvuldig afgewogen en daarna op een temperatuur van 105° tot 110° C gedurende 3 uur in een oven geplaatst.

Door middel van het Soxhlet apparaat wordt de extractie (6 uur) met petroleumether uitgevoerd (kookpunt tussen 60° en 80° C). Het extract wordt in een vooraf afgewogen kolf van

250 ml opgevangen. Daarna wordt door destillatie de overblijvende ether van het vet afgescheiden.

Om de laatste resten petroleumether te verwijderen, wordt de kolf gedurende 1 uur op een temperatuur van 105° C in de oven geplaatst. Nadat de kolf in een exicator is afgekoeld, wordt het opnieuw gewogen.

Het verschil in gewicht tussen de eerste en tweede weging geeft het gewicht aan vet weer dat het staal bevat.

b) Vetbepaling volgens de Gerber methode.

Ongeveer 3 gr visvlees wordt met een spatel in een melk-butyrometer aangebracht. Na het vullen van het butyrometer met zwavelzuur, wordt 1 ml amylalkohol toegevoegd.

Daarna wordt de butyrometer in een warm waterbad geplaatst tot het visvlees volledig is afgebroken. De centrifugetijd duurt ongeveer 10 minuten met een snelheid van 1.000 toeren per minuut.

Het afgescheiden vet dat zich in de hals van de butyrometer bevindt, wordt afgelezen in volume eenheden.

Het percentage vet wordt als volgt berekend :

$$\% \text{ vet} = \frac{\text{s.g. vet} \times 0,12 \text{ ml} \times \text{aantal graden} \times 100}{\text{gewicht staal in gram}}$$

waarbij : - het soortelijk gewicht voor haringvet 0,93 gr/cm³ bedraagt en
 - het volume van 1 graad op de butyrometer 0,12 ml bevat.

1.2. Werkwijze.

Er werd uitgegaan van een partij verse haring. Een homogeen staal werd door herhaald mengen verkregen en in een laminaatfilm verpakt. Het monster werd in de diepvries bewaard.

Met de Soxhlet methode werd het vetgehalte van de verse haring nauwkeurig bepaald.

De Gerber methode voor de bepaling van het vetgehalte van melk werd aangepast. De veranderlijke factoren als concentratie van het zwavelzuur, temperatuur en verblijftijd in het waterbad werden zodanig vastgelegd, dat de uiteindelijke resultaten, de gegevens die door de Soxhletmethode werden bekomen, benaderden.

Deze experimenten werden in het dubbel uitgevoerd om de invloed van het amylalkohol op de resultaten te kunnen nagaan.

Bij de eerste reeks proeven werd de verblijftijd in het waterbad op 1 uur gesteld. Hierbij werd respectievelijk 50, 60, 70 en 80 volume % H_2SO_4 gebruikt.

Voor elk van deze concentraties werd de invloed van de temperatuur van het warmwaterbad (60, 70 en 80° C) bestudeerd.

Vervolgens werd de aangepaste Gerber methode uitgetest voor haring met een hoog en een laag vetgehalte. De resultaten werden vergeleken met de gegevens die door middel van de Soxhlet methode werden bekomen.

Uiteindelijk werd de bruikbaarheid van de Gerber methode voor gerookte en gestoomde produkten onderzocht.

2. RESULTATEN EN BESPREKINGEN.

Tabellen 1 en 2 geven de vetgehalten in pct weer bij veranderlijke concentraties aan zwavelzuur en waterbadtemperaturen.

Tabel 1 - Procentuele vetgehalte in functie van de zuurconcentratie en de temperatuur van het waterbad (a).

Concentratie van het H_2SO_4	Temperatuur van het bad		
	60° C	70° C	80° C
50 %	Het staal is niet volledig afgebroken.		
60 %	4,72	4,56	4,64
	4,81	4,70	4,64
	4,90	4,77	4,57
	5,03	4,69	4,69
70 %	4,87	5,35	4,85
	5,33	5,35	4,65
	5,18	5,30	4,85
	5,18	4,97	5,38
80 %	5,90	5,48	4,86
	5,52	5,64	5,49
	-	5,10	5,85
	-	5,89	5,18

(a) Geen amylalkohol werd aan het staal toegevoegd.

Tabel 2 - Procentuele vetgehalte in functie van de concentratie aan zwavelzuur en de temperatuur van het waterbad (a).

Concentratie van het H_2SO_4	Temperatuur van het bad		
	60° C	70° C	80° C
50 %	Het staal is niet volledig afgebroken		
60 %	4,83	5,23	5,73
	4,79	5,07	5,77
	5,06	5,28	4,97
	5,17	5,25	4,45
	Gemiddeld 4,96	5,21	5,23
70 %	5,49	5,77	6,61
	5,46	5,61	6,19
	5,01	5,63	6,51
	5,83	5,69	6,23
	Gemiddeld 5,46	5,68	6,39
80 %	6,86	11,08	-
	7,76	9,52	10,05
	7,76	- (+)	8,65
	7,80	11,32	11,02
	Gemiddeld 7,54	10,88	10,06

(a) Eén ml amylalkohol werd aan het staal toegevoegd.

(+) Verkoling van het vet

2.1. Invloed van de zuurconcentratie en de temperatuur van het waterbad.

De rol van het H_2SO_4 is de eiwitstoffen van het vismonster op te lossen, waarbij de reactie door toevoeren van warmte wordt bevoordeligd. Uit de resultaten (tabel 1, 2) blijkt duidelijk dat zowel de zuurconcentratie, als de temperatuur een invloed hebben op het bekomen resultaat.

Bij te lage concentratie van het zwavelzuur wordt een onvolledige destructie van het staal verkregen. Dit verschijnsel kan niet worden verholpen door een verhoging van de temperatuur van het waterbad (zie H_2SO_4 60 %).

Bij te hoge zuurconcentratie verkrijgt het vet een donkerrode tot zwarte tint in plaats van de gewone lichtgele kleur ; de aflezing op de butyrometer wordt hierdoor sterk bemoeilijkt.

Er doet zich een zekere verkoling van het vet voor. (*)

Een te hoge concentratie van het zwavelzuur en te hoge waterbadtemperatuur werken reakties tussen het afgescheiden vet en het amylalkohol in de hand, waardoor het afgelezen volume sterk wordt vergroot.

2.2. Invloed van het amylalkohol.

De rol van het amylalkohol is de afscheiding van de vetten uit het zuurmengsel te bevorderen onder invloed van het centrifugeren.

Het gebruikte amylalkohol moet zo zuiver mogelijk zijn, d.w.z. dat er geen verontreinigingen mogen in voorkomen, die de resultaten kunnen verhogen. Daarom werd gebruik gemaakt van "iso-amylalkohol voor melkanalyse volgens Gerber, kookpunt 128°-132°".

Bij te hoge concentraties aan zwavelzuur (80 %) en te hoge waterbad temperatuur (80° C) lost het amylalkohol zich in het vet op en worden de resultaten verhoogd (tabel II).

2.3. Invloed van het schudden.

Bij de proefnemingen werden de gevulde butyrometers onmiddellijk geschud tot het staal volledig met zwavelzuur werd omringd. Er werd vastgesteld dat een langdurig (5 min.) en heftig schudden een gevoelige vermindering van de verblijftijd van de butyrometer in het warmwaterbad tot gevolg had.

2.4. Invloed van de verblijftijd in het warmwaterbad.

Experimenten werden verricht waarbij de verblijftijd in het waterbad respectievelijk 15, 25, 35, 45 en 60 minuten bedroeg.

De concentratie van het zwavelzuur was 70 % en de temperatuur van het waterbad werd op 70° ingesteld.

De resultaten worden in tabel 3 vermeld.

Tabel 3 - Vetgehalten in functie van de verblijftijd in het waterbad.

Tijd	15 min	25 min	35 min	45 min	60 min
Vetgehalten (in pct)	4,76	4,85	5,58	5,72	5,77
	4,84	4,91	5,18	5,45	5,61
	4,79	5,34	5,35	5,51	5,63
	5,44	4,99	5,26	5,38	5,69
Gemiddeld	4,91	5,02	5,34	5,51	5,67

Wanneer de gegevens (tabel 3) worden vergeleken met de gemiddelde waarde (5,62) verkregen met de Soxhlet methode, kan worden vastgesteld dat enkel bij een verblijftijd van 45 tot 60 minuten overeenstemmende resultaten worden bekomen.

2.5. Nauwkeurigheid van de Gerber methode.

a) Afreesfout bij gebruik van de butyrometer.

Bij de bepaling van het vetgehalte van een staal dat minder dan 20 % vet bevat, worden butyrometers gebruikt die per tiende graad zijn onderverdeeld. Bij hogere vetgehalten wordt beroep gedaan op butyrometers met een onderverdeling van 2 tienden graad.

In het eerste geval kan het resultaat tot op 0,05 graad worden geschat en in het tweede geval tot op 0,1 graad.

De afleesfout wordt dan respectievelijk 0,15 % en 0,37 % :

$$\frac{0,112 \pm 0,05 \times 100}{3} = \pm 0,15 \%$$

$$\frac{0,112 \pm 0,1 \times 100}{3} = \pm 0,37 \%$$

b) Vergelijking tussen de Gerber- en Soxhlet methode op een partij haring met laag en hoog vetgehalte.

Er werd uitgegaan van twee partijen verse haring met een laag (5,6 %) en een hoog (20 %) vetgehalte.

De nauwkeurigheid van de gewijzigde Gerber methode, voor de vetbepaling van haring, werd onderzocht en vergeleken met de Soxhlet methode. Met beide methodes werden een twintigtal analyses verricht.

Bij de toetsing van de gemiddelden, die door beide methoden wordt bekomen, is t telkens kleiner dan t_x . De nulhypothese wordt niet verworpen en er mag worden verondersteld dat beide methodes dezelfde gemiddelden geven.

De F-toets is telkens kleiner dan F_x . De nulhypothese wordt niet verworpen en er kan worden aangenomen dat beide methodes even nauwkeurig zijn.

De resultaten van deze proeven zijn in de tabellen 4 en 5 opgenomen.

Tabel 4 - Resultaten van de vergelijkende studie tussen de Gerber-
en Soxhlet methode voor verse haring met hoog vetgehalte

	Gerber	Soxhlet
Standaardafwijking	$s = 0,616$	$s = 0,52$
t - toets	38 vrijheidsgraden $= 0,01 \quad t_x = 2,70$ $= 0,1 \quad t_x = 1,68$	
F - toets tweezijdig getoetst	Aantal vrijheidsgraden $M_1 = M_2 = 19$ $= 0,01 \quad F_x = 3,32$ $= 0,1 \quad F_x = 2,12$	
Nauwkeurigheid voor dubbelproeven met 95 % waarschijnlijk- heid	$21,8 \% \pm \frac{2s}{\sqrt{2}} = 21,8 \% \pm 0,856$	$21,8 \% \pm \frac{2s}{\sqrt{2}} = 21,8 \% \pm 0,733$

Tabel 5 - Resultaten van de vergelijkende studie tussen de Gerber- en Soxhlet methode voor verse haring met laag vetgehalte

	Gerber	Soxhlet
Standaardafwijking	s = 0,273	s = 0,21
t - toets	38 vrijheidsgraden = 0,01 = 0,1	$t_x = 2,70$ $t_x = 1,68$ t = 1,046
F - toets tweezijdig getoetst	Aantal vrijheidsgraden $M_1 = M_2 = 19$ = 0,01 = 0,1	$F_x = 3,32$ $F_x = 2,12$ F = 1,69
Nauwkeurigheid voor dubbelproeven met 95 % waarschijnlijk- heid	$5,6 \% \pm \frac{2s}{\sqrt{2}} = 5,6 \% \pm 0,384$	$5,71 \% \pm \frac{2s}{\sqrt{2}} = 5,71 \% \pm 0,294$

c. Vergelijking tussen de Gerber- en Soxhlet methode op een partij gerookte en gestoomde haring.

Experimenten werden verricht om de bruikbaarheid van de Gerber methode voor gerookte en gestoomde haring uit te testen.

Uit de proefnemingen kwam tot uiting dat :

- de rookbestanddelen geen storend effect op de bepaling uitoefenen,
- de gewijzigde verhouding vet-water geen invloed op de vetbepaling heeft,
- bij de toetsing van de gemiddelden, die door beide methodes wordt bekomen t telkens kleiner dan t_x is ; de nulhypothese wordt niet verworpen en er mag worden verondersteld dat beide methodes dezelfde gemiddelden geven,
- de F-toets is telkens kleiner dan F_x ; de nulhypothese wordt niet verworpen en er kan worden aangenomen dat beide methodes even nauwkeurig zijn.

De resultaten werden in de tabellen 6 en 7 opgenomen.

Tabel 6 - Resultaten van de vergelijkende studie tussen de Gerber- en Soxhlet methode voor gerookte haring

	Gerber	Soxhlet
Standaardafwijking	$s = 0,957$	$s = 0,996$
t - toets	38 vrijheidsgraden $= 0,01$ $t_x = 2,7$ $= 0,1$ $t_x = 1,68$ $t = 0,916$	
F - toets tweezijdig getoetst	Aantal vrijheidsgraden $M_1 = M_2 = 19$ $= 0,01$ $F_x = 3,32$ $= 0,1$ $F_x = 2,12$ $F = 1,081$	
Nauwkeurigheid voor dubbelproeven met 95 % waarschijnlijk- heid	$20,66 \% \pm \frac{2s}{\sqrt{2}} = 20,66 \% \pm 1,37$	$20,37 \% \pm \frac{2s}{\sqrt{2}} = 20,37 \% \pm 1,32$

Tabel 7 - Resultaten van de vergelijkende studie tussen de Gerber- en Soxhlet methode voor gestoomde haring

	Gerber	Soxhlet
Standaardafwijking	$s = 0,668$	$s = 0,595$
t - toets	38 vrijheidsgraden $= 0,01$ $t_x = 2,7$ $= 0,1$ $t_x = 1,68$ $t = 1,461$	
F - toets tweezijdig getoetst	Aantal vrijheidsgraden $M_1 = M_2 = 19$ $= 0,01$ $F_x = 3,32$ $= 0,1$ $F_x = 2,12$ $F = 1,26$	
Nauwkeurigheid voor dubbelproeven met 95 % waarschijnlijk- heid	$18,25 \% \pm \frac{2s}{\sqrt{2}} = 18,25 \% \pm 0,95$	$18,55 \% \pm \frac{2s}{\sqrt{2}} = 18,55 \% \pm 0,836$

3. ALGEMENE BESLUITEN.

- Een wijziging van de butyrometrische vetbepaling volgens Gerber voor het analyseren van het totale vet in verse, gerookte en gestoomde haring werd uitgewerkt. In de methode werd verdund zwavelzuur 70 % aangewend. De verblijftijd in het warm waterbad werd op 60 min vastgesteld en de temperatuur van het warm waterbad werd op 70° C gebracht. Eén ml amylalkohol werd aan het staal toegevoegd.
- Uit de proefnemingen kwam tot uiting dat : (a) voor lage zuurconcentraties (60 %) een onvolledige destructie plaatsgrijpt ; (b) voor te hoge zuurconcentraties (80%) en te hoge waterbadtemperaturen 80 % het afgelezen volume sterk wordt vergroot. Schudden van de butyrometer resulteerde in een vermindering van de verblijftijd in het warm waterbad.
- Bij de vergelijkende studie tussen de Gerber- en Soxhlet methode voor verse haring met hoog en laag vetgehalte enerzijds en gerookte en gestoomde haring anderzijds wijzen de resultaten uit dat beide methoden voor de bepaling bruikbaar zijn, doch gezien de Gerber methode een snelle doseringsmethode is, verdient zij de voorkeur.

LITERATUUR.

1. Ederzeel, L.P. & Ritskes, T.M. (1966) Fishing News Internat. 5(6) p. 48-9 + 68-9.
2. Herty, Stem & Orr. (1909) J. industr. Engng. Chem., 1, 76.
3. Harris, C.P. (1930) Indistr. Engng, Chem. (Anal. Edn.), 2(4), 410-2,
4. Bartels, H. & Gerigk, K. (1964) Fleischwirtschaft, vol. 44, (8) 743-5.
5. Ronin, M.D. (1967) B.F.M.I.R.A. Techn. Circ . No. 362.

6. Barker, K. (1967) B.F.M.I.R.A. Techn. Circ. No. 378.
7. Barker, K. & Slight, H.A. (1967) B.F.M.I.R.A. Techn. Circ. No. 351.
8. Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959) Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 911.
9. Winter, E. (1963) Z. Lebensmitt. Untersuch. 123 (3), 205.
10. Hangaard, G. & Pettinati, J.D. (1959) J. Dairy Sci., 42, 1255.
11. Schain, P. (1949) Science, 110, 121.
12. Schain, P. (1950) Milk Dealer, 40, 49.
13. Sager, O., & Sanders, G.P. (1952) Milk Ind. Found. Conv. Prov., 4, 29.
14. Sager, O., Sanders, G.P., Norman, G.H. & Middleton, M.B. (1955) J. Ass. Off. agric. Chem., 38, 931.

